

## 明細書

### ジペプチドの製造法

#### 技術分野

本発明は、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物、および該微生物を用いたジペプチドの製造法に関する。

#### 背景技術

ジペプチドの製造法としては、天然物からの抽出法、化学合成法、酵素法が知られている。天然物からの抽出法は、生産できるジペプチドの種類が限られている上、天然物中に含まれる目的のジペプチドの含量が低く生産性が悪い。化学合成法によるジペプチドの合成では、官能基の保護、脱保護などの操作が必要であり、またラセミ体も合成されることから、化学合成法は経済的、効率的な方法とはいえない。また、化学合成法は大量の有機溶媒等を使うため環境衛生上も好ましい方法ではない。

酵素法によるジペプチドの合成に関しては、タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の逆反応を利用した方法 [J. Biol. Chem., 119, 707-720 (1937)]、耐熱性アミノアシル t-RNA 合成酵素を利用する方法（特開昭 58-146539 号公報、特開昭 58-209991 号公報、特開昭 58-209992 号公報および特開昭 59-106298 号公報）、非リボゾームペプチドシンセターゼ（以下、NRPS と称す）を利用する方法 [Chem. Biol., 7, 373-384 (2000)、FEBS Lett., 498, 42-45 (2001)、米国特許第 5795738 号、米国特許第 5652116 号] が知られている。

しかし、タンパク分解酵素の逆反応を利用した方法では、基質となるアミノ酸の官能基の保護、脱保護が必要であり、ペプチド形成反応の効率化およびペプチド分解反応の阻止が困難といった問題点がある。耐熱性アミノアシル t-RNA 合成酵素を利用する方法には、酵素の発現、副生物の生成反応の阻止が困難という問題点がある。NRPS を利用する方法は、酵素分子が巨大なために DNA 組換え法を用いて該酵素を発現することが困難であること、補酵素である 4'-一ホスフォパンテイン (4'-phosphopantetheine) の供給が必要であることから、効率的な製造法とはいえない。

2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する酵素としては、アスパラギン酸とフェニルアラニンが互いに縮合したジケトピペラジンから、アスパルチルフェニルアラニンを生成する活性を有する酵素

[New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts, p.201-210, Elsevier, Amsterdam (1998)および特開昭 62-208297 号公報]、および該酵素を生産する微生物の菌体を酵素源に用いたアスパルチルフェニルアラニンの製造法（特公平 8-22238 号公報）は知られているが、該酵素がアスパラギン酸とフェニルアラニンが互いに縮合したジケトピペラジン以外のジケトピペラジンからジペプチドを生成する活性、および該酵素を生産する微生物の菌体を酵素源に用いたアスパルチルフェニルアラニン以外のジペプチドの製造法については知られていない。

また、2つのグリシンが互いに縮合したジケトピペラジンからグリシルグリシンを生成する活性を有する酵素も知られている [Agric. Biol. Chem., 49, 1567-1572 (1985)] が、該酵素が2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生成する活性を有することは知られていない。

種々のジケトピペラジンを分解する能力を有する微生物は多数知られている [J. Biosci. Bioeng., 89, 602-605 (2000)、New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts, p.167-171, Elsevier, Amsterdam (1998)、J. Ferment. Bioeng., 83, 386-388 (1997)、生物工学会誌, 79, 71-77 (2001)] が、ジペプチドを生成する微生物は知られていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、ジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物および該微生物を用いたジペプチドの製造法を提供することにある。

本発明は、以下の（1）～（12）に関する。

（1） 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源および1種または2種の $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該水性媒体中からジペプチドを採取することを特徴とするジペプチドの製造法（ただし、ジケトピペラジンがアスパラギン酸とフェニルアラニンが互いに縮合したジケトピペラジンであり、かつジペプチドがアスパルチルフェニルアラニンである場合を除く）。

（2） 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、生産するジペプチドに占める1種のジペプチドの割合

が70%以上の微生物である上記(1)の製造法。

(3) 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、

[1] 被験微生物を、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンを唯一の炭素源または窒素源として含有する培地を用いて培養する工程、

[2] 上記[1]の工程で生育が認められる微生物を選択する工程、

[3] 上記[1]の工程で用いたジケトピペラジンと上記[2]の工程で選択した微生物とを水性媒体中に存在せしめたとき、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積する微生物を選択する工程、

を含む方法により得られる微生物である上記(1)または(2)の製造法。

(4) 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、

[1] 被験微生物を、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンを唯一の炭素源または窒素源として含有する培地に培養する工程、

[2] 上記[1]の工程で生育が認められる微生物を選択する工程、

[3] 上記[1]の工程で用いたジケトピペラジンと上記[2]の工程で選択した微生物とを水性媒体中に存在せしめたとき、該水性媒体中に生成、蓄積するジペプチドに占める1種のジペプチドの割合が70%以上である微生物を選択する工程、

を含む方法により得られる微生物である上記(2)の製造法。

(5) 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、シノリゾビウム(Sinorhizobium)属またはシュードモナス(Pseudomonas)属に属する微生物である上記(1)～(4)のいずれか1つの製造法。

(6) ミクロバクテリウム属に属する微生物がミクロバクテリウムルテオラム(Microbacterium luteorum)である上記(5)の製造法。

(7) 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有するミクロバクテリウム属、シノリゾビウム属またはシュードモナス属に属する微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源および1種または2種の $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該水性

媒体中からジペプチドを採取することを特徴とするジペプチドの製造法。

(8) ミクロバクテリウム属に属する微生物が、ミクロバクテリウム ルテオラムである上記(7)の製造法。

(9)  $\alpha$ -アミノ酸がアラニン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸およびオルニチンからなる群より選ばれる $\alpha$ -アミノ酸である上記(1)～(8)のいずれか1つの製造法。

(10) 2種の $\alpha$ -アミノ酸がアラニンとグルタミンであり、ジペプチドがアラニルグルタミンである上記(1)～(9)のいずれか1つの製造法。

(11) 培養物の処理物が、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物または該菌体の固定化物、或いは該菌体の機械的破碎物または超音波処理物であることを特徴とする上記(1)～(10)のいずれか1つの製造法。

(12) 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物であるミクロバクテリウム ルテオラム No.93株 (FERM BP-08513)、ミクロバクテリウム エスピ (Microbacterium sp.) No.119株 (FERM BP-08514)、シノリゾビウム エスピ (Sinorhizobium sp.) No.1株 (FERM BP-08509)、シノリゾビウム エスピ No.164株 (FERM BP-08510)、シュードモナス エスピ (Pseudomonas sp.) No.107株 (FERM BP-08511) およびシュードモナス エスピ No.108株 (FERM BP-08512)。

以下に本発明を詳細に説明する。

### 1. 本発明の方法で用いられるジケトピペラジン

本発明で用いられる1種または2種の $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンは、1種または異なる2つの $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンであればいずれでもよい。

$\alpha$ -アミノ酸としては、互いに縮合してジケトピペラジン構造を取り得る $\alpha$ -アミノ酸であれば特に限定されないが、好ましい $\alpha$ -アミノ酸としては、L- $\alpha$ -アミノ酸、D- $\alpha$ -アミノ酸、グリシンおよびそれらの誘導体をあげることができ、より好

ましくは、L- $\alpha$ -アミノ酸、グリシンおよびそれらの誘導体をあげることができる。

好ましいL- $\alpha$ -アミノ酸およびD- $\alpha$ -アミノ酸としては、L体およびD体のアラニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、オルニチンなどをあげることができる。

$\alpha$ -アミノ酸の誘導体としては、互いに縮合してジケトピペラジン構造を取り得る誘導体であれば特に限定されないが、好ましい誘導体としてはN-メチルアミノ酸などをあげることができ、具体的には、N-メチル-アラニン、N-メチル-グルタミン、N-メチル-グルタミン酸、N-メチル-グリシン、N-メチル-バリン、N-メチル-ロイシン、N-メチル-イソロイシン、N-メチル-プロリン、N-メチル-フェニルアラニン、N-メチル-トリプトファン、N-メチル-メチオニン、N-メチル-セリン、N-メチル-スレオニン、N-メチル-システイン、N-メチル-アスパラギン、N-メチル-チロシン、N-メチル-リジン、N-メチル-アルギニン、N-メチル-ヒスチジン、N-メチル-アスパラギン酸およびN-メチル-オルニチンなどをあげることができる。

L- $\alpha$ -アミノ酸、D- $\alpha$ -アミノ酸およびグリシンの誘導体としては、互いに縮合してジケトピペラジン構造を取り得る誘導体であれば特に限定されないが、好ましい誘導体としてはヒドロキシアミノ酸などをあげることができ、具体的には、 $\beta$ -ヒドロキシグルタミン、 $\beta$ -ヒドロキシグルタミン酸、 $\gamma$ -ヒドロキシグルタミン酸、 $\alpha$ -ヒドロキシグリシン、 $\beta$ -ヒドロキシバリン、 $\gamma$ -ヒドロキシバリン、 $\beta$ -ヒドロキシロイシン、 $\gamma$ -ヒドロキシロイシン、 $\delta$ -ヒドロキシロイシン、 $\beta$ -ヒドロキシイソロイシン、 $\gamma$ -ヒドロキシイソロイシン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、 $\beta$ -ヒドロキシフェニルアラニン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、2,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニン、 $\beta$ -ヒドロキシトリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、 $\alpha$ -ヒドロキシメチオニン、 $\beta$ -ヒドロキシセリン、 $\gamma$ -ヒドロキシスレオニン、S-ヒドロキシシステイン、 $\beta$ -ヒドロキシアスパラギン、 $\beta$ -ヒドロキシチロシン、 $\beta$ -ヒドロキシリジン、 $\gamma$ -ヒドロキシリジン、 $\delta$ -ヒドロキシリジン、N-ヒドロキシリジン、 $\beta$ -ヒドロキシアルギニン、 $\delta$ -ヒドロキシアルギニン、N-ヒドロキシアルギニン、 $\beta$ -ヒドロキシヒスチジン、 $\beta$ -ヒドロキシアスパラギン酸、 $\beta$ -ヒドロキシオルニチン、 $\gamma$ -ヒドロキシオルニチンおよびN-ヒドロキシオルニチンなどを

あげることができる。

上記したジケトピペラジンの製造法としては、化学合成法 [J. Comb. Chem., 3, 453-460 (2001)、Tetrahedron, 58, 3297-3312 (2002)など]、酵素法 [Chemistry Biology, 8, 997-1010 (2001)、Chemistry Biology, 9, 1355-1364 (2002)など] 等をあげることができる。

例えば、アラニンとグルタミンが互いに縮合したジケトピペラジン [以下、cyclo(Ala-Gln)と称す] の化学合成法による製造法としては、以下の方法をあげることができる。

アラニルグルタミン (例えば、Bachem 社製、Product G-1210) を 2mol/l の水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、1.5 当量のベンジルオキシカルボニルクロライドを添加してベンジルオキシカルボニル化アラニルグルタミン (以下、Z-Ala-Gln と称す。) を生成させる。該溶液に濃塩酸を添加して pH2 とし、生成した Z-Ala-Gln の結晶を取得する。該結晶を N,N-ジメチルフォルムアミド : 酢酸エチル = 4 : 1 の溶液に溶解した後、1 当量の N-ヒドロキシサクシンイミドと 1 当量のジシクロヘキシルカルボジイミドを添加してサクシンイミド化 Z-Ala-Gln (以下、Z-Ala-Gln-ONSu と称す) を生成させる。次に、該溶液を減圧濃縮して Z-Ala-Gln-ONSu の結晶を取得し、該結晶をメタノール : 水 = 95 : 5 の溶液に懸濁する。該溶液にパラジウムカーボンを添加して、cyclo(Ala-Gln)を生成させた後、減圧濃縮することで cyclo(Ala-Gln)の結晶を取得することができる。

化学合成法、酵素法は、アミノ酸の官能基の保護と脱保護をする必要がないため、 $\alpha$ -アミノ酸の構造に依存することなく、効率的にジケトピペラジンを製造することができる。

## 2. 本発明の方法で用いられる微生物

本発明の方法で用いられる 2 種の  $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物は、該能力を有する微生物であればいずれの微生物であってもよく、自然界から分離された微生物、該微生物に薬剤や紫外線処理を施すことにより得られる変異株、細胞融合株または遺伝子組換え株などをあげることができる。

2 種の  $\alpha$ -アミノ酸としては、互いに縮合してジケトピペラジン構造を取り得る  $\alpha$ -アミノ酸であれば、特に制限されないが、好ましくは L- $\alpha$ -アミノ酸、D- $\alpha$ -

アミノ酸、グリシンおよびそれらの誘導体からなる群より選ばれる異なる2つの $\alpha$ -アミノ酸をあげることができる。

好ましいL- $\alpha$ -アミノ酸およびD- $\alpha$ -アミノ酸、並びにL- $\alpha$ -アミノ酸、D- $\alpha$ -アミノ酸およびグリシンの誘導体としては、上記1のアミノ酸および誘導体をあげることができる。

本発明の方法で用いられる2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物としては、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンから生産されるジペプチドに占める1種のジペプチドの割合が、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは100%である微生物をあげることができる。ただし、New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts, p.201-210, Elsevier, Amsterdam (1998)、および特開昭62-208297号公報に記載の酵素を生産する微生物は、本発明の微生物に含まれない。

2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンから生産されるジペプチドに占める1種のジペプチドの割合とは、2種の $\alpha$ -アミノ酸をA、Bとし、AとBが互いに縮合したジケトピペラジンから生成したジペプチドをA-B、およびB-A（-はアミド結合を表す）としたとき、生成した総ジペプチド量 (A-B + B-A)に対するA-B、またはB-Aの割合をいう。

本発明の方法で用いられる微生物は、例えば以下の方法により取得することができる。

約0.5~5gの採取した土壌を滅菌水に懸濁し、該土壌懸濁液を室温で10分間~1時間穏やかに振盪してから、1~30分間静置した後、0.05~2mlの上澄液を、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンを唯一の炭素源または窒素源として含有する寒天培地（以下、DKP含有寒天培地と称す）に塗布し、25~60°Cで1~5日間培養してコロニーを形成させる。

上記で用いるジケトピペラジンは、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンであれば特に限定されないが、好ましくはL- $\alpha$ -アミノ酸が縮合したジケトピペラジン、より好ましくはL-アラニンとL-グルタミンが互いに縮合したジケトピペラジンをあげることができる。

上記で用いるDKP含有寒天培地は、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピ

ペラジンを唯一の炭素源または窒素源として含む培地であり、かつジケトピペラジンを唯一の炭素源として用いる場合は窒素源および無機塩類を、ジケトピペラジンを唯一の窒素源として用いる場合は炭素源および無機塩類を含む培地であればいずれの培地であってもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプンおよびデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノールプロパノール等のアルコール類であり、かつ窒素非含有の物質をあげることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸または有機酸のアンモニウム塩等をあげることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等をあげることができる。

次に、出現したコロニーを、DKP 含有寒天培地およびDKP 含有寒天培地からジケトピペラジンを除いた寒天培地に塗布し、25~60°Cで 1~5 日間培養する。DKP 含有寒天培地で生育し、DKP 含有寒天培地からジケトピペラジンを除いた寒天培地では生育しない菌株を選択することにより、該ジケトピペラジンを資化する能力を有する微生物を取得することができる。

上記で取得した菌株を合成寒天培地に塗布して 25~60°Cで 1~5 日間培養した後、生育した微生物の 1 白金耳量を上記で用いたジケトピペラジンを含有する液体培地に植菌し、25~60°Cで 1~5 日間、振盪培養する。

培養終了後、培養液の上清を分析し、ジケトピペラジンが検出されない培養液を与える菌株を、ジケトピペラジンを分解する能力を有する菌株として選択する。培養液の上清の分析法は、用いたジケトピペラジンを検出することができる方法であれば、いずれの方法であってもよく、例えば高速液体クロマトグラフィーを用いる方法などをあげることができる。

上記で選択した菌株を合成寒天培地に塗布して 25~60°Cで 1~5 日間培養した後、1~5g/l のジケトピペラジンを含有する液体培地に 1 白金耳量植菌し、25~60°Cで 1~5 日間振盪培養する。培養終了後、培養物を遠心分離して菌体を回収し、生理食塩水などを用いて菌体を洗浄する。洗浄菌体は、そのまま、あるいは一旦 -80°Cで凍結

保存し、融解してからその後の操作に用いることができる。

菌体を凍結した場合は、常温で融解した後、湿菌体量で 5~50g/l になるように、緩衝液に懸濁して、菌体懸濁液を調製する。緩衝液は、いずれの緩衝液でもよく、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液などをあげることができる。

該懸濁液には、生成するジペプチドの分解活性を阻害するために、金属イオン、キレート剤またはジペプチドアナログなどを添加してもよい。

該懸濁液に 1~5g/l になるようにジケトピペラジンを添加して反応液を調製し、該反応液を 25~60°C で 1~24 時間、穏やかに振盪する。反応終了後、該反応液を遠心分離した後、上清を分析し、ジペプチドの生成を検出する。ジペプチドの生成、蓄積が検出される反応液を与える菌株を選択することにより、ジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物を取得することができる。

ジペプチドの検出法は、ジペプチドを検出することができる方法であればいずれでもよく、例えば上清に含有されるジペプチドを 9-フルオレニルメトキシカルボニル (FMOC) 化した後に HPLC 分析する方法をあげることができる。

上記した方法により取得できる本発明の微生物としては、例えばミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、シノリゾビウム (*Sinorhizobium*) 属またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物をあげることができ、ミクロバクテリウム属に属する微生物としてはミクロバクテリウム ルテオラム (*Microbacterium luteolum*) をあげることができる。

本発明の微生物として、より具体的には、ミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株、ミクロバクテリウム エスピー (*Microbacterium* sp.) No.119 株、シノリゾビウム エスピー (*Sinorhizobium* sp.) No.1 株、シノリゾビウム エスピー No.164 株、シュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) No.107 株、シュードモナス エスピー No.108 株、およびこれらの菌株の継代培養により得られる微生物、これらの菌株を用いて作製される細胞融合株、突然変異株などをあげることができる。

上記した株は、本発明者らが土壤から新たに分離した微生物である。以下に、各々の菌株の同定結果を示す。

土壤から分離された No.93 および No.119 株は、形態観察の結果、いずれもグラム陽性桿菌であった。No.93 株および No.119 株より調製したゲノム DNA を鑄型にして、*Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 210-213 (1992) に記載の 16S rDNA ユニバーサルプライ

マー29f と 1492r をプライマーセットとして用い、それぞれの菌株の 16S rDNA 部分配列を增幅、取得した。PCR 産物を ExoSap-IT (ファルマシア社製) を用いて精製し、塩基配列を決定した。

決定した No. 93 株および No. 119 株の 16S rDNA 部分配列をそれぞれクエリーにして Blast 検索を行なったところ、いずれもグラム陽性細菌であるアクチノバクテリア綱のミクロバクテリウム属に属する微生物の 16S rDNA と高い相同意を有することが確認された。そこで、rRNA データベースから関連菌種の 16S rDNA 配列を取得して系統解析を行なった。rRNA 分子の 2 次構造情報を加味した多重アライメントファイルとして取得した関連菌種の配列に対して、No. 93 株および No. 119 株の配列をマルチアライメント作成ソフト clustalW (EMBL の clustalW ダウンロードサイトより入手) の profile アライメントメニューを用いて整列した。

作成されたアライメントを基に PHYLIP パッケージの dnadist プログラム (University of Washington, Felsenstein Lab のダウンロードサイトより入手) を用いて木村の 2 パラメーターに基づく各菌株間の遺伝距離を計算し、neighbor プログラム (University of Washington, Felsenstein Lab のダウンロードサイトより入手) を用いて近隣結合法による系統関係の推定を行なった。系統樹の描画は、NJplot プログラム (Pole Bio-Informatique Lyonnais のダウンロードサイトより入手) を用いて行なった。また、PHYLIP パッケージの seqboot プログラムを用いて 100 セットの再抽出を行ない、ブートストラップ検定法による系統樹の各分枝の信頼度を確認した。

その結果、両株ともミクロバクテリウム属のミクロバクテリウム ルテオラム、ミクロバクテリウム オキシダンス (Microbacterium oxydans)、およびミクロバクテリウム リケファシエンス (Microbacterium liquefaciens) と極めて近縁であることが示された。また No. 93 株は、特にミクロバクテリウム ルテオラムの配列と類縁性が高く、そのクラスタリングは 93% のブートストラップ値で支持された。しかしながら、No. 93 株を含めたこれら 4 菌株の系統距離は極めて短く、これら菌株群内の正確な系統関係を解析することは困難であった。

そこで、これら 3 菌種と No. 93 株の種レベルの分類学的関係を明確にするために、DNA/DNA 交雑実験を実施した。供試株としては No. 93 株、ミクロバクテリウム ルテオラム、ミクロバクテリウム オキシダンス、およびミクロバクテリウム リケファ

シエンスの各基準株〔それぞれ(財)醸酵研究所 IFO1574 株、IFO15586 株、IFO15037 株〕、陰性対照としてコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ATCC13032 株を用いた。各菌株から公知の方法によりゲノム DNA を抽出し、ハイドロキシアパタイトを用いて精製した DNA を実験に用いた。

DNA/DNA 交雑実験の結果、No.93 株はミクロバクテリウム ルテオラムの基準株である IFO15074 株と 97%以上の高い DNA/DNA 相同性を示した。また、16S rDNA 系統解析の結果、同様に近縁性が示されていたミクロバクテリウム オキシダンス、ミクロバクテリウム リケファシエンスの基準株との間にも比較的高い DNA/DNA 相同性を示したが、その値は 50~60%と近縁異種の菌株間に観察される DNA/DNA 相同値と同等であった。

以上の結果から、No.93 株をミクロバクテリウム ルテオラム、No.119 株をミクロバクテリウム エスピーであると同定した。

土壤から分離した No.1 株および No.164 株は、形態観察の結果、グラム陰性の桿菌であった。No.1 株および No.164 株より調製したゲノム DNA をそれぞれ鑄型にして、上記した方法と同様の方法により、各々の株の 16S rDNA 部分配列の塩基配列を決定し、Blast 検索に供したところ、 $\alpha$  プロテオバクテリアのシノリゾビウム属に属する微生物の 16S rDNA 配列と高い相同性を有することが確認された。そこで、rRNA database から関連菌種の 16S rDNA 配列を取得して、上記と同様の方法で系統解析を行なった。その結果、両株とも、シノリゾビウム属の菌株と系統群を形成し、シノリゾビウム モレンス (Sinorhizobium morelense) およびエンシファー アドヘレンス (Ensifer adhaerens) に極めて近縁であった。エンシファー属は、シノリゾビウム属としてまとめられるべきであるとの勧告が国際微生物学連盟の原核微生物分類委員会に提言されている [Int. J. Syst. Envol. Microbiol., 52, 2337(2002)]。

以上の系統解析結果と原核生物分類委員会の見解に基づき、No.1 株および No.164 株をシノリゾビウム エスピーと同定した。

土壤から分離した No.107 株および No.108 株は、形態観察の結果、グラム陰性の桿菌であった。No.1 株および No.164 株より調製したゲノム DNA をそれぞれ鑄型にして、上記した方法と同様の方法により、各々の株の 16S rDNA 部分配列の塩基配列を決定し、Blast 検索に供したところ、 $\gamma$  プロテオバクテリアのシュードモナス属に属する微生物の 16S rDNA 配列と高い相同性を有することが確認された。そこで、rRNA

database から関連菌種の 16S rDNA 配列を取得して、上記と同様の方法で系統解析を行なった。その結果、両株とも、シュードモナス属の菌株と系統群を形成し、特にシュードモナス グラミニス (*Pseudomonas graminis*) と極めて近縁であった。

以上の系統解析結果から、No.107 株および No.108 株をシュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) と同定した。

ミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株、ミクロバクテリウム エスピー No.119 株、シノリゾビウム エスピー No.1 株、シノリゾビウム エスピー No.164 株、シュードモナス エスピー No.107 株およびシュードモナス エスピー No.108 株は、ブタベスト条約に基づいて平成 15 年 10 月 17 日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) に、それぞれ FERM BP-08513、FERM BP-08514、FERM BP-08509、FERM BP-08510、FERM BP-08511 および FERM BP-08512 として寄託されている。

### 3. 本発明の製造法

本発明の製造法は、2 種の  $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源および 1 種もしくは 2 種の  $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該水性媒体中からジペプチドを採取することを特徴とするジペプチドの製造法に関する。ただし、上記においてジケトピペラジンがアスパラギン酸とフェニルアラニンが互いに縮合したジケトピペラジンであり、かつジペプチドがアスパルチルフェニルアラニンである製造法は本発明に含まれない。好ましくは、上記においてジケトピペラジンがグリシンが互いに縮合したジケトピペラジンである製造法もまた本発明に含まれない。

また、本発明の製造法は、ミクロバクテリウム属、シノリゾビウム属またはシュードモナス属に属する微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源および 1 種もしくは 2 種の  $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該水性媒体中からジペプチドを採取することを特徴とするジペプチドの製造法に関する。

2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物、ミクロバクテリウム属に属する微生物、シノリゾビウム属に属する微生物、およびシュードモナス属に属する微生物の培養は、微生物の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物、ミクロバクテリウム属に属する微生物、シノリゾビウム属に属する微生物、およびシュードモナス属に属する微生物としては、上記2の微生物をあげることができる。

該微生物を培養する培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸または有機酸のアンモニウム塩、含窒素化合物、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーピリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕、大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15~60°Cがよく、培養時間は、通常5時間~7日間である。培養中pHは4~10に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

培養物の処理物としては、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物および該菌体の固定化物などの生菌体を含

む処理物、並びに該菌体の機械的破碎物および超音波処理物などの粗酵素抽出物を含む処理物などをあげることができる。

ジペプチドの生成反応に用いられる酵素源は、特定のジケトピペラジンから 30°C で 1 分間に 1 mmol のジペプチドを生成することのできる活性を 1 単位 (U) として、1 mU/l~1000 U/l であり、好ましくは 10 mU/l~100 U/l の濃度で用いる。

基質である 1 種もしくは 2 種の  $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンは、1~500g/l の濃度で用いる。

ジペプチドの生成反応に用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

ジペプチドの生成反応において、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミーン S-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・プロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオン F2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネットなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミン FB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、各種ジペプチドの生成反応を促進するものであればいずれでもよく、1 種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常 0.1~50 g/l の濃度で用いられる。有機溶媒としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどがあげられ、通常 0.1~50 ml/l の濃度で用いられる。

ジペプチドの生成反応は、水性媒体中、pH 5~10、好ましくは pH 6~9、20~60°C の条件で 1~96 時間行う。該生成反応において、必要に応じてジペプチドの分解を抑制するために塩化コバルト ( $\text{CoCl}_2$ ) 等の無機塩、EDTA 等のキレート剤、ベスタチン等のジペプチド分解活性の阻害物質などを添加することができる。

水性媒体中に生成したジペプチドの採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の単離および精製方法によって行うことができる。

#### 4. 本発明の微生物

本発明の微生物としては、ミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株 (FERM BP-08513)、ミクロバクテリウム エスピーNo.119 株 (FERM BP-08514)、シノリゾビウム エスピーNo.1 株 (FERM BP-08509)、シノリゾビウム エスピー No.164 株 (FERM BP-08510)、シュードモナス エスピーNo.107 株 (FERM BP-08511) およびシュードモナス エスピー No.108 株 (FERM BP-08512) をあげることができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

なお、実施例で用いたアラニンとグルタミンが互いに縮合したジケトピペラジン [以下、cyclo (Ala-Gln) と称す] は以下の方法により調製した。

50g の Ala-Gln (Bachem 社製、Product G-1210) を 200ml の 2mol/l 水酸化ナトリウム溶液に溶解した後、51g のベンジルオキシカルボニルクロライドと 150ml の 2mol/l 水酸化ナトリウム溶液を添加して室温で 2 時間攪拌した。該溶液に濃塩酸を加えて pH2 とすることにより、ベンジルオキシカルボニル化アラニルグルタミン (以下、Z-Ala-Gln と称す) の結晶 85g を取得し、乾燥させた。

次に、35g の Z-Ala-Gln の結晶を、200ml の N,N-ジメチルフォルムアミド : 酢酸エチル = 4 : 1 の溶液に溶解した後、12g の N-ヒドロキシサクシンイミドを添加した。さらに 22g のジシクロヘキシルカルボジイミドを添加した後、50ml の酢酸エチルを添加して室温で 12 時間攪拌した。該溶液に 1ml の酢酸を添加した後、濾過し、得られた濾液を減圧濃縮してサクシンイミド化 Z-Ala-Gln (以下、Z-Ala-Gln-ONSu と称す) の結晶 30g を取得した。

該結晶をイソプロピルアルコールで洗浄し、乾燥して得られた 23g の Z-Ala-Gln-ONSu の結晶を、300ml の 95% メタノール水溶液に懸濁し、500mg のパラジウムカーボンを添加して室温で 12 時間攪拌した。該溶液に 100ml の水を加えた後、濾過し、得られた濾液を減圧濃縮して結晶を取得した。該結晶を 200ml のメタノールと 30ml のトリエチルアミンからなる溶液に懸濁して室温で 12 時間攪拌した。該溶液を濾過して得られた結晶を、メタノールで洗浄した後、乾燥し、cyclo(Ala-Gln) の結晶 8g を取得した。

また、ジケトピペラジンおよびジペプチドの分析、定量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い、以下の方法により行った。

ジケトピペラジンは、Aminex HPX-87H イオン交換カラム (7.8mmID × 300mm、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製) を用いて分析、定量した。移動相には 5mmol/l の

硫酸とアセトニトリルを7:3で混合した溶液を用いた。移動相の流速は0.6ml/min、カラム温度は60°C、検出波長はUV 250nmである。

ジペプチドは、9-フルオレニルメトキシカルボニル(FMOC)を用いて誘導体化した後にHPLCで分析した。FMOC誘導体化は、100mmol/lのホウ酸緩衝液(pH9.0)で希釈した試料に、等容量の6mmol/lのクロロギ酸9-フルオレニルメチル(FMOC-Cl)アセトン溶液を加え、室温で40分間静置することにより行った。

次に、該混合溶液に1.25倍容量のヘキサンを加え激しく攪拌した後、上層のヘキサン層を取り除く操作を2回繰り返し、残った下層に等容量の250mmol/lのホウ酸緩衝液(pH5.5)とアセトニトリルの3:1の混合液を加え、FMOC化試料とした。

該FMOC化試料を、Develosil ODS-HG-3カラム(4.6mmID×250mm、野村化学社製)を用いて分析、定量した。HPLC分析の条件には、ジペプチドおよび試料に含有される不純物の種類により、下記の条件(1)または条件(2)を用いた。

#### 条件(1)

移動相には、20mmol/lのリン酸アンモニウム緩衝液(pH6.5。アンモニア水でpH調整)とメタノールの混合比が17:3の移動相Aとアセトニトリルと水の混合比が9:1の移動相Bを用いた。移動相の流速は1ml/分、移動相Aと移動相Bの混合比は、0分のとき82:18であり、その後30分かけて、1:99まで直線的に変化させた。カラム温度は40°C、励起波長254nm、検出波長630nmの蛍光検出で測定した。

#### 条件(2)

移動相には、6ml/l酢酸溶液(pH3.6。トリエチルアミンでpH調整)とアセトニトリルの混合比が8:2の移動相Cと6ml/l酢酸溶液(pH3.6。トリエチルアミンでpH調整)とアセトニトリルの混合比が3:7の移動相Dを用いた。移動相の流速は1ml/分、移動相Cと移動相Dの混合比は、0分のとき85:15であり、その後25分かけて、0:100まで直線的に変化させた。カラム温度は40°C、励起波長254nm、検出波長630nmの蛍光検出で測定した。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例1 ジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物の取得

###### (1)：ジケトピペラジンを資化する能力を有する微生物のスクリーニング

土壤を採取し、約2gの該土壤を滅菌水10mlに懸濁した。該土壤懸濁液を室温で30分間穏やかに振盪し、10分間静置した後、0.1mlの上澄液を、cyclo(Ala-Gln)2g/l

を唯一の炭素源として含有する寒天培地A〔硝酸アンモニウム 2.5g/l、リン酸水素二ナトリウム 1g/l、リン酸二水素カリウム 0.5g/l、硫酸マグネシウム ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.5g/l、硫酸鉄 ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.1g/l、塩化カルシウム ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) 0.1g/l、硫酸亜鉛 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.88mg/l、硫酸銅 ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) 0.393mg/l、塩化マンガン ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) 0.072mg/l、ホウ砂 ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) 0.088mg/l、モリブデン酸アンモニウム [ $(NH_4)_6Mo_7O_24 \cdot 4H_2O$ ] 0.037mg/l、チアミン塩酸 0.001mg/l、リボフラビン 0.002mg/l、パントテン酸カルシウム 0.002mg/l、ピリドキシン塩酸 0.002mg/l、ビオチン 0.0001mg/l、p-アミノ安息香酸 0.001mg/l、ニコチン酸 0.002mg/l、寒天 15g/l、pH7.2〕に塗布し、30°Cで2日間培養してコロニーを形成させた。該コロニーを、2g/lのcyclo(Ala-Gln)を含む寒天培地A、およびcyclo(Ala-Gln)を含まない寒天培地Aに塗布し、30°Cで2日間培養した。cyclo(Ala-Gln)を含む寒天培地Aで生育し、cyclo(Ala-Gln)を含まない寒天培地Aでは生育しない菌株を選択した。

上記で選択した菌株を寒天培地B〔普通ブイヨン培地(極東製薬工業社製) 20g/l、寒天15g/l、pH7.2〕に塗布して30°Cで1日間培養した後、液体培地A〔グルコース 2g/l、硝酸アンモニウム 2g/l、リン酸二水素カリウム 1g/l、リン酸水素二カリウム 3g/l、硫酸マグネシウム ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.3g/l、硫酸鉄 ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 10mg/l、硫酸マンガン ( $MnSO_4 \cdot nH_2O$ ) 10mg/l、モリブデン酸アンモニウム [ $(NH_4)_6Mo_7O_24 \cdot 4H_2O$ ] 0.037mg/l、硫酸亜鉛 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.88mg/l、硫酸銅 ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) 0.393mg/l、塩化マンガン ( $MnCl_2 \cdot 7H_2O$ ) 0.72mg/l、ホウ砂 ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) 0.088mg/l、チアミン塩酸 0.001mg/l、リボフラビン 0.002mg/l、パントテン酸カルシウム 0.002mg/l、ピリドキシン塩酸 0.002mg/l、ビオチン 0.0001mg/l、p-アミノ安息香酸 0.001mg/l、ニコチン酸 0.002mg/l〕に2g/lとなるようにcyclo(Ala-Gln)を添加した40mlの培養液に、出現したコロニーの1白金耳分を植菌し、300ml容のフラスコを用いて30°Cで1日間、振盪培養した。

培養上清をHPLCにて分析し、培養液中にcyclo(Ala-Gln)が残存していなかった菌株を、cyclo(Ala-Gln)を資化する能力を有する菌株として選択した。

実施例2 ジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物の取得  
(2): cyclo(Ala-Gln)を分解する能力を有する微生物のスクリーニング

実施例1で選択した菌株を寒天培地Bに塗布して30°Cで1日間培養した後、1白金

耳量の菌体を 2g/1 の cyclo(Ala-Gln)を含有する 40ml の液体培地Aに植菌し、300ml フラスコを用いて、30°Cで 1 日間、振盪培養した。該培養液を遠心分離(8,000rpm、10 分間)して菌体を沈殿させ、該菌体を 0.85%の塩化ナトリウム水溶液に懸濁して遠心分離(8,000rpm、10 分間)をする操作を 2 回繰り返した後、得られた菌体を-80°Cで 1 時間凍結した。

該凍結菌体を常温で融解した後、湿菌体重量が約 20g/1 になるように 50mmol/l の リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁した。該懸濁液 0.9ml および 10g/1 の cyclo(Ala-Gln)を含む 50mmol/l のリン酸カリウム緩衝液(pH7.5) 0.1ml を 2ml 容の プラスチックチューブに入れて、30°Cで 8 時間、穩やかに振盪した。反応液を遠心分離(10,000rpm、10 分間)した後、上清を HPLC にて分析した。

その結果、多くの反応液で cyclo(Ala-Gln)の減少が認められた。例えば、ミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株、ミクロバクテリウム エスピー No.119 株、シノリゾビウム エスピー No.1 株、シノリゾビウム エスピー No.164 株、シュードモナス エスピー No.107 株およびシュードモナス エスピー No.108 株の反応液では、いずれも 8 時間で約 0.5g/1 の cyclo(Ala-Gln)が消失していた。

上記の菌株を、2 種の  $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する菌株の候補とした。

**実施例 3 グリシンとグルタミンが互いに縮合したジケトピペラジン [以下、cyclo(Gly-Gln)と称す] の分解活性**

実施例 2 で調製したミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株の凍結融解菌体懸濁液 0.9ml および 5g/1 の cyclo(Gly-Gln) (Bachem 社製) を含む 50mmol/l のリン酸カリウム緩衝液(pH7.5) 0.1ml を 2ml 容のプラスチックチューブに入れて、30°Cで 8 時間、穩やかに振盪した。反応液を遠心分離(10,000rpm、10 分間)した後、上清を HPLC にて分析した結果、8 時間で約 0.1g/1 の cyclo(Gly-Gln)が消失していた。

**実施例 4 ロイシンとフェニルアラニンが互いに縮合したジケトピペラジン [以下、cyclo(Leu-Phe)と称す] の分解活性**

実施例 2 で調製したミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株の凍結融解菌体懸濁液 0.9ml および 300mg/1 の cyclo(Leu-Phe) (Bachem 社製) を含む 70%エタノール水溶液 0.1ml を 2ml 容のプラスチックチューブに入れて、30°Cで 24 時間、穩やかに振盪した。反応液を遠心分離(10,000rpm、10 分間)した後、上清を HPLC にて分析し

た結果、24時間で約10mg/lのcyclo(Leu-Phe)が消失していた。

### 実施例5 Ala-Glnの生産

実施例2で調製したミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株またはミクロバクテリウム エスピー No.119 株の凍結融解菌体懸濁液 0.9ml に、終濃度がそれぞれ 2g/l および 1mmol/l になるように、cyclo(Ala-Gln)および塩化コバルトを添加した 1ml の反応液を 2ml 容のプラスチックチューブに入れて、30°Cで 2 時間、穏やかに振盪した。反応液を遠心分離(10,000rpm, 10 分間)した後、上清を FMOC 化した後に HPLC にて分析した。結果を第1表に示す。

第1表

菌株	アラニルグルタミン (mg/l)	グルタミニルアラニン (mg/l)
ミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株	37	ND
ミクロバクテリウム エスピー No.119 株	29	ND

ミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株およびミクロバクテリウム エスピー No.119 株が cyclo(Ala-Gln)から生成するジペプチドに占めるアラニルグルタミンの割合は 100% であった。

### 実施例6 グルタミニルアラニン (Gln-Ala) の生産

実施例2で調製したシノリゾビウム エスピー No.1 株、シノリゾビウム エスピー No.164 株、シュードモナス エスピー No.107 株またはシュードモナス エスピー No.108 株の凍結融解菌体懸濁液 0.9ml に、終濃度がそれぞれ 2g/l および 10mmol/l になるように、cyclo(Ala-Gln)および EDTA を添加した 1ml の反応液を 2ml 容のプラスチックチューブに入れて、30°Cで 2 時間、穏やかに振盪した。該反応液を遠心分離(10,000rpm、10 分間)して菌体を沈殿させ、上清を FMOC 化した後に HPLC にて分析した。結果を第2表に示す。

第2表

菌株	アラニルグルタミン (mg/1)	グルタミニルアラニン (mg/1)
シノリゾビウム エスピー No.1 株	34	92
シノリゾビウム エスピー No.164 株	27	187
シュードモナス エスピー No.107 株	11	163
シュードモナス エスピー No.108 株	11	150

シノリゾビウム エスピー No.1 株、シノリゾビウム エスピー No.164 株、シュードモナス エスピー No.107 株およびシュードモナス エスピー No.108 株が cyclo(Ala-Gln) から生成するジペプチドに占めるグルタミニルアラニンの割合は、それぞれ 73%、87%、94% および 92% であった。

## 請求の範囲

1. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源および1種または2種の $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該水性媒体中からジペプチドを採取することを特徴とするジペプチドの製造法(ただし、ジケトピペラジンがアスパラギン酸とフェニルアラニンが互いに縮合したジケトピペラジンであり、かつジペプチドがアスパルチルフェニルアラニンである場合を除く)。

2. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、生産するジペプチドに占める1種のジペプチドの割合が70%以上の微生物である請求項1記載の製造法。

3. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、

[1]被験微生物を、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンを唯一の炭素源または窒素源として含有する培地を用いて培養する工程、

[2]上記[1]の工程で生育が認められる微生物を選択する工程、

[3]上記[1]の工程で用いたジケトピペラジンと上記[2]の工程で選択した微生物とを水性媒体中に存在せしめたとき、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積する微生物を選択する工程、

を含む方法により得られる微生物である請求項1または2記載の製造法。

4. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、

[1]被験微生物を、2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンを唯一の炭素源または窒素源として含有する培地に培養する工程、

[2]上記[1]の工程で生育が認められる微生物を選択する工程、

[3]上記[1]の工程で用いたジケトピペラジンと上記[2]の工程で選択した微生物とを水性媒体中に存在せしめたとき、該水性媒体中に生成、蓄積するジペプチドに占める1種のジペプチドの割合が70%以上である微生物を選択する工程、

を含む方法により得られる微生物である請求項2記載の製造法。

5. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物が、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、シノリゾビウム(Sinorhizobium)属またはシュードモナス(Pseudomonas)属に属する微生物である請求項1～4のいずれか1項に記載の製造法。

6. ミクロバクテリウム属に属する微生物が、ミクロバクテリウム ルテオラム(Microbacterium luteorum)である請求項5記載の製造法。

7. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有するミクロバクテリウム属、シノリゾビウム属またはシュードモナス属に属する微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源および1種または2種の $\alpha$ -アミノ酸またはその誘導体が互いに縮合したジケトピペラジンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にジペプチドを生成、蓄積させ、該水性媒体中からジペプチドを採取することを特徴とするジペプチドの製造法。

8. ミクロバクテリウム属に属する微生物が、ミクロバクテリウム ルテオラムである請求項8記載の製造法。

9.  $\alpha$ -アミノ酸が、アラニン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸およびオルニチンからなる群より選ばれる $\alpha$ -アミノ酸である請求項1～8のいずれか1項に記載の製造法。

10. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が、アラニンとグルタミンであり、ジペプチドがアラニルグルタミンである請求項1～9のいずれか1項に記載の製造法。

11. 培養物の処理物が、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物または該菌体の固定化物、或いは該菌体の機械的破碎物または超音波処理物であることを特徴とする請求項1～10のいずれか1項に記載の製造法。

12. 2種の $\alpha$ -アミノ酸が互いに縮合したジケトピペラジンからジペプチドを生産する能力を有する微生物であるミクロバクテリウム ルテオラム No.93 株 (FERM BP-08513)、ミクロバクテリウム エスピー (Microbacterium sp.) No.119 株 (FERM BP-08514)、シノリゾビウム エスピー (Sinorhizobium sp.) No.1 株 (FERM BP-08509)、

シノリゾビウム エスピ一No.164 株 (FERM BP-08510)、シユードモナス エスピ一 (Pseudomonas sp.) No.107 株 (FERM BP-08511) およびシユードモナス エスピ一 No.108 株 (FERM BP-08512)。

PCT

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない] IPO

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物 材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.163)
0-2	国際出願番号	PCT/JP2004/017980
0-3	出願人又は代理人の書類記号	1635

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載 された微生物又は生物材料に関連している 。	
1-1	記載頁	12
1-2	行	11
1-3	寄託の表示 寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6
1-3-3	寄託の日付	2003年10月17日 (17.10.2003)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08513
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき 、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料 分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載 された微生物又は生物材料に関連している 。	
2-1	記載頁	12
2-2	行	11
2-3	寄託の表示 寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
2-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6
2-3-3	寄託の日付	2003年10月17日 (17.10.2003)
2-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08514
2-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき 、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料 分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

1635

PCT

2/4

REC'D 16 DEC 2004

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

WIPO

PCT

3	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
3-1	記載頁 行	12 12
3-3	寄託の表示 3-3-1 寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
3-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6
3-3-3	寄託の日付	2003年10月17日 (17.10.2003)
3-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08509
3-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
3-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
4	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
4-1	記載頁 行	12 12
4-3	寄託の表示 4-3-1 寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
4-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6
4-3-3	寄託の日付	2003年10月17日 (17.10.2003)
4-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08510
4-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
4-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

1635

3/4

PCT

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

REC'D 16 DEC 2004

PCT

5	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
5-1	記載頁	12
5-2	行	12
5-3	寄託の表示 寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
5-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6
5-3-3	寄託の日付	2003年10月17日 (17.10.2003)
5-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08511
5-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
5-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
6	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
6-1	記載頁	12
6-2	行	12
6-3	寄託の表示 寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
6-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6
6-3-3	寄託の日付	2003年10月17日 (17.10.2003)
6-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08512
6-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
6-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	萬崎茂夫

4/4

PCT

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	16 December 2004
0-5-1	権限のある職員	間 壱一郎

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE  
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
ISSUED PURSUANT TO RULE 7.1 BY THE INTERNATIONAL  
DEPOSIT AUTHORITY IDENTIFIED AT THE BOTTOM OF THIS PAGE.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

協和醸酵工業株式会社  
取締役社長 松田 譲 殿

あて名 〒 100-8185  
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示) Pseudomonas sp. No.108	(受託番号) FERM BP- 08512
---	--------------------------

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、 2003年 10月 17日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。

そして、 年 月 日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

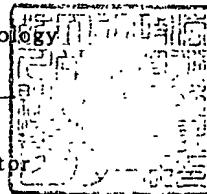
5. 国際寄託当局

名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depositary  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 岡 修

Dr. Syuichi Oka, Director



あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

平成 15年 (03) 10月 17日

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE  
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

REC'D 16 DEC 2004  
WIPO PCT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL  
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

### 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

協和醸酵工業株式会社  
取締役社長 松田 譲 殿

あて名 〒 100-8185  
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

#### 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示) Pseudomonas sp. No.107	(受託番号) FERM BP- 08511
---	--------------------------

#### 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

#### 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、 2003年 10月 17日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

#### 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、年月日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。

そして、年月日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

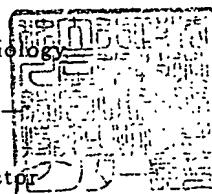
#### 5. 国際寄託当局

名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depository  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 岡 修

Dr. Syuichi Oka, Director



あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE  
WIPO PCT  
16 DEC 2004

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL  
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

## 原寄託についての受託証

氏名（名称）

協和醸酵工業株式会社  
取締役社長 松田 譲 殿

あて名 〒100-8185  
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示) Sinorhizobium sp. No.164	(受託番号) FERM BP- 08510
---	--------------------------

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、2003年10月17日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、年月日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。

そして、年月日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

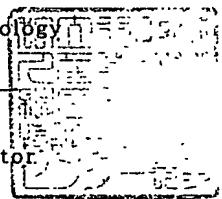
## 5. 国際寄託当局

名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depository  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 岡 修

Dr. Syuichi Oka, Director



あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

平成15年(03)10月17日

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE  
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
REC'D 16 DEC 2004  
WIPO PCT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL  
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

## 原寄託についての受託証

氏名（名称）

協和醸酵工業株式会社  
取締役社長 松田 譲 殿

あて名 〒100-8185  
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
Sinorhizobium sp. No.1	FERM BP- 08509

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、2003年10月17日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、年月日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。

そして、年月日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

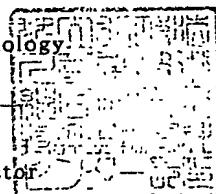
## 5. 国際寄託当局

名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depository  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 岡 修

Dr. Syuichi Oka, Director



あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

REC'D 16 DEC 2004  
PCT

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL  
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

## 原寄託についての受託証

氏名（名称）

協和醸酵工業株式会社  
取締役社長 松田 謙 殿

あて名 〒100-8185  
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
Microbacterium sp. No.119	FERM BP- 08514

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、2003年10月17日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、年月日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。

そして、年月日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

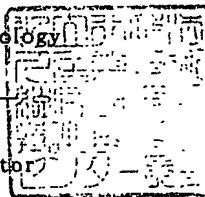
## 5. 国際寄託当局

名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depository  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 岡 修

Dr. Syuichi Oka, Director



あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

BUTAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS 2004  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE  
WIPO PCT

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL  
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

## 原寄託についての受託証

氏名（名称）

協和醸酵工業株式会社  
取締役社長 松田 譲 殿

あて名 〒100-8185  
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
Microbacterium luteolum No.93	FERM BP- 08513

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、2003年10月17日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

## 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、年月日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。

そして、年月日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

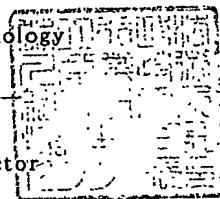
## 5. 国際寄託当局

名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depository  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 岡 修一

Dr. Syuichi Oka, Director



あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,  
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017980

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/06, C12N1/20// (C12N1/20, C12R1:01),  
(C12N1/20, C12R1:38)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/06, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), REGISTRY (STN), CA (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KANZAKI, H. et al., Novel Diketopiperazine Metabolism in a Microorganism: Two-Step Hydrolysis of Cyclo(Gly-Leu) to Amino Acids and Preliminary Characterization of Cyclo (Gly-Leu) Hydrolase and Dipeptidase. J.BIOSCI. BIOENG. 2000, Vol.89, No.6, pages 602 to 605	1-11 12
X A	Hiroshi KANZAKI et al., "Biseibutsu Yurai no Diketopiperazine-Kan Kagobutsu Taisha Koso ni yoru Seiri Kassei Busshitsu Seisan", Seibutsu Kogakkaishi 2001, Vol.79, No.3, pages 71 to 77	1-11 12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 March, 2005 (09.03.05)

Date of mailing of the international search report  
22 March, 2005 (22.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017980

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	KANZAKI, H. et al., Microbial Hydrolysis of Diketopiperazaines: Different Types of Diketopiperazine-Assimilating Bacteria. J.Ferment.Bioeng. 1997, Vol.83, No.4, pages 386 to 388	1-11 12
A	MURO, T. et al., Purification and Some Properties of Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase from a Strain of Bacillus sp. No.106. Agric.Biol.Chem. 1985, Vol.49, No.6, pages 1567 to 1572	1-12
A	JP 62-208297 A (Ajinomoto Co., Inc.), 12 September, 1987 (12.09.87), & EP 220028 A & US 5179009 A & DE 3668910 G & KR 9505424 B1	1-12

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 21/06, C12N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:01), (C12N 1/20, C12R 1:38)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12P 21/06, C12N 1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), REGISTRY (STN), CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	KANZAKI, H. et al. Novel Diketopiperazine Metabolism in a Microorganism: Two-Step Hydrolysis of Cyclo(Gly-Leu) to Amino Acids and Preliminary Characterization of Cyclo(Gly-Leu) Hydrolase and Dipeptidase. J. BIOSCI. BIOENG. 2000, Vol. 89, No. 6, p. 602-605	1-11 12
X A	神崎 浩 他, 微生物由来のジケトピペラジン環化合物代謝酵素による生理活性物質生産 生物工学会誌 2001, Vol. 79, No. 3, p. 71-77	1-11 12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリーエ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.03.2005

国際調査報告の発送日

22.03.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y A	KANZAKI, H. et al. Microbial Hydrolysis of Diketopiperazines: Different Types of Diketopiperazine-Assimilating Bacteria. J. Ferment. Bioeng. 1997, Vol. 83, No. 4, p. 386-388	1-11 12
A	MURO, T. et al. Purification and Some Properties of Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase from a Strain of Bacillus sp. No. 106. Agric. Biol. Chem. 1985, Vol. 49, No. 6, p. 1567-1572	1-12
A	JP 62-208297 A (味の素株式会社) 1987. 09. 12 & EP 220028 A & US 5179009 A & DE 3668910 G & KR 9505424 B1	1-12